



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ N.º de publicación: ES 2 041 219

⑫ Número de solicitud: 9200762

⑬ Int. Cl.⁵: C12N 1/38

C12N 1/20

/(C12N 1/20

C12R 1:065)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **09.04.92**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.93**

Fecha de concesión: **20.04.94**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.94**

⑱ Fecha de publicación del folleto de patente:
01.06.94

⑲ Titular/es: **Consejo Superior de
Investigaciones Científicas
Serrano, 117
28006 Madrid, ES**

⑳ Inventor/es: **Martín González, Antonio;
Moreno Paz, Mercedes y
Marín López, Pilar**

㉑ Agente: **No consta.**

㉒ Título: **Procedimiento de activación microbiológica en la fijación de nitrógeno.**

㉓ Resumen:

Procedimiento de activación microbiológica en la fijación de nitrógeno.

Un procedimiento en el que a partir de cultivos celulares de microorganismos fijadores de nitrógeno se cultivan en incubadoras orbitales utilizando como sustrato un medio de cultivo, que contenga una concentración salina y un azúcar, al que se añade hierro en forma reducida, alcanzando un pH de alrededor de 7,4,teniéndolo a una temperatura de al menos 30°C, una velocidad mínima de 160 rpm y durante un tiempo superior a 160 horas. Otra alternativa es sumergir los cultivos celulares en el medio de cultivo durante al menos 50 horas y a una temperatura alrededor de 30°C.

La aplicación de este procedimiento: como cultivos de microorganismos, los de los géneros Azotobacter y/o de Azospirillum; para la biosíntesis de aminoácidos, tales como ácido glutámico, metionina y lisina, para la biosíntesis de proteínas, para la biosíntesis de alginatos y para la obtención de biofertilizantes.

Aviso: Se puede realizar la consulta prevista por el artº 37.3.8 LP.

DESCRIPCION

Estado de la técnica. Antecedentes

Los microorganismos fijadores de N_2 atmosférico del género *Azotobacter* y *Azospirillum* se emplean como fertilizantes nitrogenados en cultivos de interés agrícola como el maíz, trigo, patata, arroz, remolacha, tabaco, lino, avena, zanahoria, repollo, tomate y otros (Pat. N° 554.728, 1986).

Además de ser útiles como biofertilizantes estos microorganismos están capacitados para sintetizar sustancias activadoras del crecimiento vegetal como las fitohormonas (citoquininas, auxinas, ...). (Pat. N° 545.692, 1985).

Variantes de estos microorganismos son de interés industrial por su capacidad para sintetizar proteínas y amoniácidos esenciales para la alimentación, (Pat. N° 475.500, 1978, Pat N° 502.988, 1981). Algunos de estos mutantes de *Azotobacter* están capacitados también para sintetizar mucopolisacáridos de alto poder gelificante como los alginatos (Pat N° 491.783, 1980 y Pat N° 547.927, 1985).

El empleo de hierro reducido en el cultivo de microorganismos para la industria o la agricultura (biofertilizantes) no ha sido investigado quizás por tratarse de un producto insoluble en agua.

En el estudio bibliográfico realizado ha confirmado que este procedimiento todavía no ha sido estudiado y no se refleja en ninguna patente ni publicación de ningún tipo. Considerando únicamente como antecedentes de la invención los siguientes:

- "Método de obtención de proteínas y amoniácidos esenciales para la alimentación, por tratamiento electrónico de microorganismos fijadores de N_2 . Pat 475.500 (1975).
- "Procedimiento de obtención de mucopolisacáridos mediante mutantes específicos de *Azotobacter*". Pat. 491.783 (1980).
- "Procedimiento de obtención de un polisacárido de gran transparencia producido por un mutante de *Azotobacter vinelandii*". Pat. N° 545.927 (1985).
- "Procedimiento de obtención de un factor de crecimiento a partir de células de estirpes silvestres de *Azotobacter*. Pat. N° 545.692 (1985).
- "Procedimiento de obtención de un mutante de *Azotobacter vinelandii* capaz de fijar N_2 en el suelo en concentraciones superiores a las estirpes silvestres conocidas". Pat. N° 554.728 (1986).

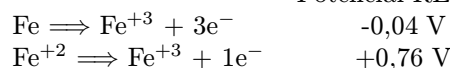
Descripción de la invención

Los cultivos celulares de los microorganismos fijadores de N_2 se cultivan en incubadoras orbitales con una temperatura alrededor de 30°C y a una velocidad de aproximadamente 160 r.p.m. durante al menos 160 horas, preferiblemente sobre 168 horas, o en cultivos sumergidos durante 52 horas también sobre los 30°C.

Los medios de cultivo para el crecimiento de microorganismos fijadores de N_2 utilizan SO_4Fe o Cl_2Fe que proporcionan el hierro imprescindible para la enzima nitrogenasa.

La sustitución del hierro ionizado por el hierro reducido da lugar a un mayor potencial de reducción por aportar mayor número de electrones por átomo de hierro, acelerando y catalizando la fijación de N_2 y por consiguiente todo el sistema metabólico de las células.

Potencial REDOX



- Aumento del poder reductor ($3e^-$) (-0,04 V) del Fe^0 frente al Fe^{+2} ($1e^-$) (+ 0,76 V)
- La concentración óptima, estudiada después de investigar los gradientes del hierro reducido, fueron de 6 mg por 100 ml de medio de cultivo.
- El primer aminoácido sintetizado por las estirpes de *Azotobacter* y *Azospirillum* es el ácido glutámico que al emplear hierro reducido en lugar de hierro ionizado se triplica su producción.
- Al utilizar la turba como soporte de los microorganismos fijadores de N_2 para su empleo como Biofertilizantes se puede añadir también el hierro pulverizado y reducido en lugar del hierro ionizado para aumentar el rendimiento en la producción de nitrógeno orgánico. Para ello conviene homogeneizar lo mejor posible la turba con el hierro reducido para facilitar el contacto de éste con las células fijadoras de N_2 .

Método de realización

Las estirpes de *Azotobacter (vinelandii)* y *Azospirillum* son inoculadas en un medio sólido con agar-agar al 1,5% con la siguiente concentración salina:

KH_2PO_4	→ 0,2 g/l
K_2HPO_4	→ 0,8 g/l
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	→ 0,2 g/l
$CaSO_4$	→ 0,05 g/l
$FeSO_4$	→ 6 mg/l
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	→ 1 mg/l

Además de esta concentración salina se añadió el sustrato de sacarosa al 1,6%. El pH inicial del medio de cultivo era de 7,4. (En lugar de la sacarosa se puede emplear otro azúcar, aunque los resultados no son tan óptimos).

En los medios de cultivo con hierro reducido, marca Merck de una pureza del 99,5%, se sustituyó el Fe ionizado en forma de $FeSO_4$ anhidro por 6 mg por cien ml de hierro cero. Se inicia el método sembrado en superficie en este medio solidificado, bien en tubos inclinados o en placas Petri, las diferentes estirpes de *Azotobacter (vinelandii)* y *chroococcum*) y de *Azospirillum brasiliense*.

Las estirpes seleccionadas para estas pruebas fueron las siguientes:

1. *Azotobacter vinelandii* 25APV
2. *Azotobacter vinelandii* 382DSM y *Azospirillum brasilense* 590CECT.
3. *Azotobacter vinelandii* 24APV y *Azospirillum brasilense* 40AM.
4. *Azotobacter vinelandii* 382DSM
5. *Azotobacter vinelandii* 22APV
6. *Azotobacter chroococcum* 203CECT

Las siglas corresponden al número de la estirpe y al centro de colección de la cual proceden. Así, CECT (colección Española de Cultivos Tipo), DSM (deutsche Sammlung von Mikroorganismen) APV y AM (Colección de la Unidad de Microbiología Aplicada del Centro de Investigaciones Biológicas).

Después de sembrar estos microorganismos fijadores de N₂ en medio sólido se incubaron durante 48 horas a 28°C en una estufa de cultivos.

Una vez cultivadas en medio sólido se inocularon en matraces con el mismo medio de cultivo líquido (sin agar -agar) en matraces esterilizados en autoclaves a 110°C durante 30' y a 2 atmósferas de presión. Los matraces eran de una capacidad de 300 ml y contenían 100 ml de medio de cultivo. Después de sembrados se mantuvieron durante 168 horas a 30°C y 160 r.p.m. en un incubador orbital (New Brunswick Scientific G24 Enviromental Incubator Shaker).

Las células se separaron del líquido metabólico por centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 20 minutos para desecarlas y determinar el peso seco. El líquido metabólico se analizó para estudiar la cantidad de nitrógeno fijado y el contenido de los aminoácidos formados. La concentración de amonio y de amoniácidos se determinó con un Autoanalizador de Aminoácidos marca Biotronik, Modelo LC7000.

Posteriormente se incubaron las estirpes seleccionadas en cultivos sumergidos con fermentadores de 2 l de capacidad y 1.1. de medio de cultivo.

A través de estos fermentadores pasamos 160 l/h de aire estéril (esterilizado por filtros Millipore de 0,45 µm de poro previamente esterilizados en autoclave a 110°C durante 30').

La composición, el pH y la temperatura eran iguales que en los matraces cultivados anteriormente, sin embargo el tiempo de incubación era sólo de 52 horas porque es cuando se alcanza el mayor peso seco de las células y el punto óptimo en fijación de N₂.

El estudio en fermentadores se hizo también por duplicado para estudiar el efecto del hierro reducido (Fe⁰) sobre el hierro ionizado (Fe⁺²).

Los resultados de los análisis del nitrógeno fijado y los aminoácidos sintetizados se confirmaron en las dos formas de cultivo.

Resultados

Estirpes	Con Fe ⁺²	Con Fe ⁰
24APV + + 40AM	peso seco de células 2,20 g/l	3,86 g/l
22APV	N total fijado 8,973 ng/ml	15,557 ng/ml
DSM + + 40AM	ácido glutámico 656 ng/ml	1.757 ng/ml
DSM + + 590CECT	lisina 559 ng/ml	1.194 ng/ml
DSM + + 590CECT	metionina 40 ng/ml	95 ng/ml

Este procedimiento es de interés en las siguientes aplicaciones:

1. En medios de cultivo destinados al crecimiento de microorganismos fijadores de N₂.
2. Biosíntesis de aminoácidos.
3. Biosíntesis de proteínas.
4. Biosíntesis de alginatos.
5. Producción de Biofertilizantes.

El hierro reducido era de la marca Merck de una pureza mínima del 99,5%.

Las ventajas a que dan lugar el empleo del Fe reducido sobre el Fe ionizado son las siguientes:

1. Mayor fijación de N₂ atmosférico
2. Mayor poder de reducción para la biosíntesis de amoniaco.
3. Mayor biomasa celular en menor tiempo, acelerándose los procesos metabólicos de la célula.
4. Biosíntesis de amoniácidos esenciales en mayor concentración.
5. Mayor y mejor poder de esos microorganismos como biofertilizantes.
6. Mayor concentración de nitrógeno orgánico e inorgánico procedente de la biosíntesis.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de activación microbiológica en la fijación de nitrógeno **caracterizado** porque microorganismos fijadores de nitrógeno se cultivan en incubadoras orbitales, a una temperatura de al menos 30°C, con una velocidad mínima de 160 rpm y durante un tiempo superior a 160 horas, utilizando como sustrato un medio de cultivo, que contiene una concentración salina y un azúcar, preferentemente sacarosa, al que se añade

hierro en forma reducida.

2. Un procedimiento según reivindicación 1, **caracterizado** porque los cultivos celulares se sumergen en el medio de cultivo durante al menos 50 horas, a una temperatura sobre 30°C y en los que se hace pasar aire estéril en una cantidad alrededor de 160 l/h.

3. Un procedimiento según reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** por la utilización como cultivos celulares de microorganismos los de los géneros Azotobacter y/o de Azospirillum.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 041 219
⑫ N.º solicitud: 9200762
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 09.04.92
⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑮ Int. Cl.⁵: C12N 1/38, 1/20 // (C12N 1/20, C12R 1:065)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	Base de datos CAS, 067-079818; MOSHKOVSKII Y.S. et al. "Application of the Moessbauer effect in studying the role in iron in biological nitrogen fixation". DOK L. AKAD. NAUK SSSR (DANKAS); 66 Vol. 174 (1), págs. 215-7, 1967	
A	ES-A-475500 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS) * Página 3, líneas 1-19; página 4, líneas 1-9 *	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe 30.09.93	Examinador Asha Sukhwani	Página 1/1
--	-----------------------------	---------------